П.В. Соловьев, Е.В. Баранова, С.Ф. Бикетов, А.А. Непоклонов
ВНИИ Ветеринарной Санитарии, Гигиены и Экологии РАСХН, Москва, ГНЦ Прикладной Микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора Минздрава РФ, п. Оболенск Московской области

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОРЕАКТИВНЫХ БЕЛКОВ КЛЕЩА DEMODEX BOVIS

Введение

Демодекоз – широко распространенное в нашей стране и зарубежом паразитарное заболевание млекопитающих, вызываемое клещами рода Demodex. В настоящее время описано по разным источникам от 134 до 140 видоспецифичных клещей. На кошках обитает два вида Demodex cati и Demodex gatoi, у коз Demodex philloides, у свиней Demodex caprae, у крупного рогатого скота Demodex bovis, у собак Demodes canis и т.д. Болеют демодекозом и люди. У человека паразитируют два вида: Demodex folliculorum, обитающий в волосяных фолликулах, и Demodex brevis, обитающий в сальных железах.

Клещ Demodex bovis – наиболее важный, с ветеринарной точки зрения клещ, который, поражая шкуры животных, наносит ощутимый экономический ущерб кожевенной промышленности нашей страны.

Толчком к изучению демодекоза крупного рогатого скота явился случай массового, вызванного неизвестными причинами, поражения кожевенного сырья на Спасском госкожзаводе в Рязанской области. В 1927 году А. Дьяковым и М. Люксембургом было сообщено, что: «при сортировке шкур крупного рогатого скота оказалось до 20-24% «пораженного» сырья [2].

Одной из основных биологических особенностей клеща Demodex bovis является строго колониальная форма существования вида в коже крупного рогатого скота. Имея микроскопические размеры, обитает клещ исключительно в гипертрофированных волосяных фолликулах колониями, размер которых варьирует от 1 мм до 1 см. В каждой из них может находиться до 5000 клещей и более на различных стадиях развития. На одном животном можно обнаружить от 1 до 200 и более колоний. Заболевание обычно проходит в пустулезной форме. Узелки (пустулы) располагаются в толще кожи, иногда небольшими гнездами. Поражается в основном передняя часть тела животного (голова, плечи, подгрудок, шея, передние конечности). В очень редких случаях поражается вся поверхность кожи [1,3].

На кожевенном сырье, полуфабрикате и готовых кожах демодекозный порок проявляется по-разному. В сырье это бугорки различного размера, со слегка синюшным или желтоватым оттенком. В полуфабрикате колонии выглядят в виде небольших бугорков с каналом или без, проникающих на 1/2 - 2/3 толщины кожи. На готовых кожах демодекозные пороки видны с поверхности в виде небольших вдавленных пятен. На некоторых кожах в центре этих пятен имеются небольшие отверстия. С обратной стороны кожи видны углубления от 1 до 10 мм в диаметре с рваными краями, которые образуются в процессе выделки кож при выпадении вместилища клещей. Нередко обнаруживаются крупные дыры, возникающие на месте колоний собранных «гнездами». Все эти пороки приводят к существенному снижению стоимости готовых кож и экономическим потерям кожевенных заводов [1].

В литературе встречаются данные о морфологическом составе крови, белковом, минеральном, липидном обмене, а также функциональном состоянии печени, почек и соединительной ткани кожи при демодекозе крупного рогатого скота.

Установлено, что количество иммуноглобулинов в сыворотке крови коров больных демодекозом увеличивается пропорционально степени поражения животных. Что связано с хроническим течением заболевания, при котором происходят глубокие деструктивные изменения в коже, развивается воспаление вследствие интоксикации организма продуктами распада кожи и жизнедеятельности клещей.

Наличие периваскулярных лимфогистиоцитарных инфильтратов и продуктивного эндоваскулита при демодекозе крупного рогатого скота указывают на роль реакции гиперчувствительности замедленного типа в механизме ответа на демодекозную инвазию. Клеточные реакции при таком иммунном воспалении отражают динамику тканевой элиминации продуктов реакции антиген-антитело.

При исследовании почек коров больных демодекозом выявлен хронический мезангиопролиферативный гломерулонефрит, который обусловлен иммунологическими механизмами и связан либо с от-

ложением на базальной мембране капилляров клубочков иммунных комплексов, либо с образованием антител к базальной мембране [1].

Хорошо изучены изменения в гуморальном, локальном кожном и системном клеточном иммунитете при демодекозе у собак [7].

У большинства видов клещей рода Demodex хорошо изучена морфология и биология. Предложено множество схем лечения и профилактики демодекоза, более глубоко изучаются вопросы патогенеза и хозяино-паразитарных взаимоотношений при этом заболевании. Однако отсутствуют данные о конкретных молекулах клещей Demodex участвующих в иммунопатогенезе заболевания и неизвестны антигены, на которые происходит иммунный ответ.

Целью наших исследований является изучение иммунореактивных белков клеща Demodex bovis, и поиск антигенов, индуцирующих иммунный ответ хозяина. Для этого мы использовали подход, реализованный при идентификации иммунореактивных белков клеща Sarcoptes scabiei и личинок подкожного овода: Hypoderma lineatum и Hypoderma bovis [5, 8]. В настоящий момент эти белковые антигены являются основой диагностических тест систем для определения специфических антител к возбудителю саркоптоза и гиподерматоза животных соответственно.

Материалы и методы

Сыворотки крупного рогатого скота. Индивидуальные образцы сыворотки были получены из крови коров черно-пестрой породы больных демодекозом в слабой, средней и сильной степени поражения, а также от животных без клинических признаков демодекоза (здоровых животных).

Биологический материал содержащий клещей D. Bovis. Для выявления иммунореактивных белков клеща Demodex bovis от больных животных было собрано содержимое демодекозных колоний I, II, III типа (классификация по Скосырских) по методике Полякова Д.К. [4, 3] Колонии были собраны в период с июня по декабрь 2006 года.

Полученный материал объединялся при помощи перемешивания и хранился при -20° С в плотно закрытой пластиковой пробирке вплоть до использования. Экстракция белков из материала проводилась путем перетирания 0.5 г колоний в 4 мл 6М гуанидинхлорида при комнатной температуре в стеклянном гомогенизаторе с последующей ультразвуковой дезинтеграцией суспензии на аппарате VirSonic 100. Режим обработки 3 раза по 10 сек. с перерывом 30 сек. на льду.

Контроль гомогенизации проводили путем микроскопии капли суспензии. Конец гомогенизации определяли по отсутствию целых клещей в поле зрения микроскопа. Полученный образец центрифугировали при 5000g 10 минут. Полученный супернатант диализовали против 2.5 литров 0,01М фосфатно-солевого буфера (pH 7.2) ночь при 4°С в диализной мембране MW 5000 (Serva). Отдиализованный раствор хранили аликвотами при -20 в плотно закрытой пробирке вплоть до использования.

Иммуноферментный анализ (ИФА). В лунки планшета для иммуноферментного анализа вносили 0,1 мл экстракта демодекозных колоний в 0,01М Na-карбонатном буфере (pH 9,6) инкубировали ночь при 4°С. Каждую сыворотку тестировали в разведении от 1/100 до 1/12800. Сыворотки титровали и инкубировали в 0,01М фосфатно-солевом буфере (pH 7.2) 1 час при 37. Пероксидазный коньюгат Anti-bovine IgG (whole molecule) (Sigma) использовали в разведении 1/8000. Планшеты инкубировали 1 час при 37°С. В качестве хромогенного реагента использовали раствор перекиси водорода с 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (ТМВ) («МДЛ», Россия). Результаты оценивали по оптической плотности окрашенного раствора, используя Titertek Multiscan ELISA ридер с фильтром 450 нм, после остановки реакции 1М H_2SO_4.

Электрофорез и Иммуноблотин. Экстракт колоний клещей D. bovis сепарировали в 12% электрофорезном полиакриламидном геле в присутствии натрий – додецилсульфата по Laemmli (Laemmli U.K. 1970). Окраску гелей проводили Кумасси G250. Электрофорез проводили при 70 mA. Электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану Hybond C проводили по Towbin (Towbin H, Staehlin T., 1979). При 200 mA в трис-глициновом буфере с изопропанолом 20% 1 час. Блокировку мембран проводили 5% обезжиренным молоком в 0,01М фосфатно-солевом буфере (pH 7,2) 1 час при 37° С. Мембраны инкубировали с тестируемыми сыворотками в разведении 1/25 1 час при 37° С. Пероксидазный коньюгат Anti-bovine IgG (whole molecule) (Sigma) использовали в разведении 1/1000, время инкубации 1 час при 37° С. Результаты реакции визуализировали добавлением свежеприготовленной субстратной смеси для пероксидазы, содержащей 0,05% диаминобензидина и 0,015% H_2O_2 (ДАБ). В некоторых опытах мембрану после переноса сразу замачивали в 10 мл 0,01М фосфатно-

солевого буфера (pH 7.2) на 2 минуты и и выявляли пероксидазную активность тем же субстратом.

Выделение иммуноглобулинов класса G (IgG). Иммуноглобулины выделялись из сывороток трех коров с сильной, средней и слабой степенью поражения, и из сыворотки здоровой коровы методом ионообменной хроматографии на DEAE-сефарозе 4B (Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Sweden). Фракцию IgG элюировали раствором (0,15M NaCl + 0,01M Трис-HCl) pH 8,6. Степень чистоты IgG определяли при помощи электрофореза в 12% полиакриламидном геле. Специфичность IgG подтверждали методом непрямого иммуноферментного анализа с использованием пероксидазного коньюгата Anti-bovine IgG (whole molecule) (Sigma).

Иммуноблоттинг с флуоресцирующими антителами. Очищенные иммуноглобулины класса G больных и здоровых животных метили флуоресцирующей меткой при помощи Fluoro Tag FITC Conjugation Kit (Sigma). После проведения электрофореза и иммуноблоттинга, мембраны инкубировали с мечеными иммуноглобулинами в разведении 1/20 1 час при 37° C. Тестируемые немеченые сыворотки в иммуноблотинге проявляли иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими антивидовыми против иммуноглобулинов быка («МЕДГАМАЛ» Россия) в разведении 1/20.

После инкубации мембраны отмывали, просушивали и визуализировали путем облучения ультрафиолетом с длиной волны 365 нм под углом 45 градусов на облучателе для тонкослойной хроматографии MinUVIS фирмы DESAGA (Германия).

Результаты и обсуждение

Попытка обнаружить антитела к белкам D. bovis в сыворотке больных животных методом непрямого иммуноферментного анализа не принесла результатов. Значения оптической плотности сывороток при тестировании в ИФА больных животных и здоровых достоверно не отличались. Дальнейшие эксперименты выявили, что экстракт из колоний клещей D. bovis в ИФА неспецифически связывается с антивидовым конъюгатом.

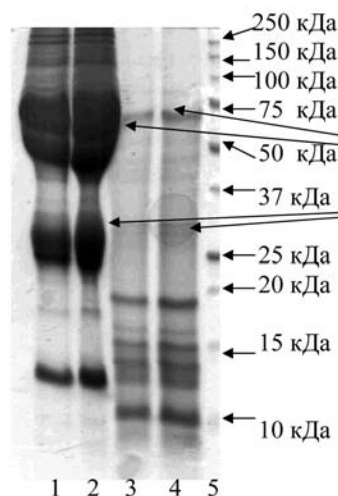
Такое связывание может быть объяснено наличием коровьих иммуноглобулинов в экстракте из (Рисунок 1) или IgG связывающих компонентов (типа белка A или коплемента крови).

Результаты электрофореза в 12% полиакриламидном геле (Рисунок 1) и иммуноблоттинга (Рисунок 2) указывают на присутствие иммуноглобулинов в экстракте. Из рисунков 1 и 2 видно, что в составе экстракта присутствуют белковые компоненты, которые связываются с антивидовым конъюгатом идентично IgG в областях с молекулярной массой около 64 кДа и 28 кДа.

Экстракт, кроме этого содержит другие IgG связывающие компоненты в области с молекулярной массой от 24 Кда до 10 кДа и от 37 кДа 60 кДа.

Следует отметить, что специфическое связывание IgG из сывороток коров не регистрировали.

Помимо компонентов неспецифически связывающих IgG, мы обнаружили, что белок молекулярной массой 10 кДа обладает



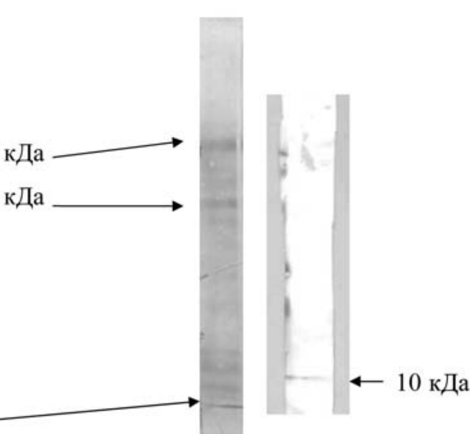


Рисунок 1. Электофореграмма сывороток и экстракта в 12% геле. 1 – сыворотка здоровой коровы, 2 – сыворотка больной коровы, 3, 4 - экстракт, 5 – маркеры молекулярного веса

Рисунок 2. Иммуноблоттинг мембраны с антивидовым конъюгатом

Рисунок 3. Мембрана после переноса, проявленная в ДАБ

пероксидазной активностью, поскольку он проявлялся на мембране после инкубации в ДАБ. (Рисунок 3)

При повторении опытов с использованием высокоразрешающего геля (градиентный полиакриламидный гель 7,5-20%, длина геля 16 см, толщина геля 1,5 мм) удалось получить более четкое разделение низкомолекулярной фракции белков экстракта, и оказалось, что в реакцию с субстратным буфером вступает триплет белков в области 10 кДа (Рисунок 4).

IgG связывающую способность триплета проверяли в иммуноблоттинге с флуоресцирующими антителами.

После проявки на всех мембранах в ультрафиолетовом свете четко видны те же полосы, что и на мембране проявленной ДАБ, триплет с которой не флуоресцирует.

Таким образом, триплет белков помимо пероксидазной активности обладает способностью неспецифически связывать иммуноглобулины.

Выводы

При изучении состава содержимого колоний клещей Demodex bovis установлено, что содержимое колоний имеет сложный белковый состав состоящий, главным образом, из белков клеща и белков хозяина. Наиболее ярко выражено присутствие в содержимом белков с молекулярным весом от 20 кДа и менее (рисунок 2). При проведении опытов по изучению иммунореактивных белков клеща D. bovis нами обнаружен триплет белков в области 10 кДа. Этот триплет обладает пероксидазной активностью и способен неспецифически связывать иммуноглобулины.

Проведя анализ баз данных протеинов и литературных источников мы выяснили, что IgG связывающей и пероксидазной активностями обладает белок слюны клеща Ixodes scapularis (Salp 25D номер в генбанке AF209911) который является гомологом глутатион пероксидазы некоторых эукариотических организмов (глутатион пероксидаза крупного рогатого скота имеет молекулярный вес 84 кДа). Показано, что на данный белок при кормлении иксодовых клещей вырабатываются специфические антитела [6].

Из литературных источников известно, что при демодекозе у животных возможно образование иммунных комплексов [1, 7], которые как предполагается, играют существенную роль в иммунопатогенезе заболевания.

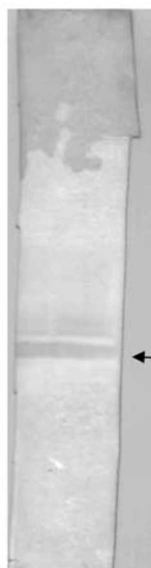


Рисунок 4. Мембрана, проявленная в ДАБ

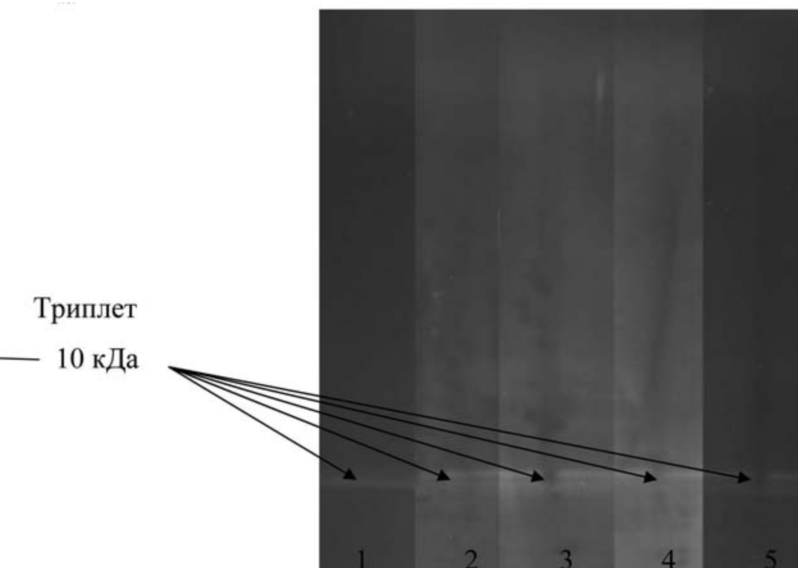


Рисунок 5. Мембраны, проявленные флуоресцирующими антителами*
*** Мембраны проявляли: 1 - иммуноглобулинами, полученными от больного животного, мечеными флуоресцин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ); 2 - иммуноглобулинами, полученными от здорового животного, мечеными ФИТЦ; 3 - сывороткой от больного животного и иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими антивидовыми против иммуноглобулинов быка (МЕДГАМАЛ) в разведении 1/20; 4 - сывороткой от здорового животного и иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими антивидовыми против иммуноглобулинов быка (МЕДГАМАЛ) в разведении 1/20. 5 - иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими антивидовыми против иммуноглобулинов быка (МЕДГАМАЛ) в разведении 1/20**

В связи с этим мы считаем, что выделенный нами из содержимого колоний клещей Demodex bovis триплет белков, обладая IgG связывающей активностью, с большой вероятностью может образовывать иммунные комплексы в организме больных животных. Исследование данной гипотезы является предметом нашей дальнейшей работы.

Считаем, что дальнейшее изучение состава демодекозных колоний, определение свойств его отдельных компонентов, в частности иммунореактивных белков, сможет стать основой в работе по созданию специфических диагностических и лечебных препаратов при демодекозе животных.

РЕЗЮМЕ

Предполагается, что некоторые биологически активные белки демодекозных клещей могут играть важную роль в иммунопатогенезе демодекоза. Мы попытались идентифицировать такие белки клеща Demodex bovis. Наши результаты показывают, что триплет белков клеща в области 10 кДа демонстрирует некоторую биологическую активность, в частности: способность неспецифически связывать IgG и пероксидазную активность. Мы предполагаем что данный триплет может образовывать иммунные комплексы в организме больных животных.

SUMMARY

Some demodex mites bioactive proteins are supposed to play important role in immunopathogenesis of demodicosis. We tried to identify those proteins in Demodex bovis mites. Our results indicated that triplet of proteins being obtained from Demodex bovis mites in 10 kDa area demonstrated some biological activity: nonspecific IgG binding and peroxidase activity in particular. As a result of our investigations we suggested that this triplet can produce immune complexes in affected host body.

Литература

1. Василевич Ф.И. Демодекоз крупного рогатого скота и собак (эпизоотология, патогенез, совершенствование мер борьбы и профилактики: Дисс. докт. ветерин. наук., Москва. 1998.
2. Дьяков А. Люксембург М. Случай массового заболевания сырья на заводе в г. Спасске. // Вестник кожевенной промышленности и торговли, 1927. № 6-7, 240-241.
3. Поляков Д. К. К вопросу эпизоотологии, клинической картины и диагностики демодекоза крупного рогатого скота. // Тр. ВНИИВСЭ, 1957, 11, 173-193.
4. Скосырских Л. Н. Демодекоз крупного рогатого скота и совершенствование методов борьбы с ним: Дисс. канд. ветерин. Наук., Тюмень. 1993.
5. Bornstein S., Wallgreen P., Serodiagnosis of sarcoptic mange in pigs // Vet. Rec. 141, 1997. P. 8–12.
6. Das S., Banerjee G., De Ponte K., Marcantonio N., Kantor F., Fikrig E Salp25D, an Ixodes scapularis Antioxidant, Is 1 of 14 Immunodominant Antigens in Engorged Tick Salivary Glands// The Journal of Infectious Diseases., 2001. №184. P. 1056–1064.
7. Day M.J. An immunohistochemical study of the lesions of demodicisis in the dog // J.Comp.Path., 1997. Vol. 116. P. 203-216
8. Colwell, D.D., Baron, R.W. Early detection of cattle grub infestation (Hypoderma lineatum DeVill. and H.bovis L.) (Diptera: Oestridae) using ELISA // Med. Vet. Entomol., 1990. Vol. 4. P. 35–42.

УДК 619:618.19-002+636.2+619:579.22

А.А. Соломатин, В.Г. Турков

ФГОУ ВПО Ивановская государственная сельскохозяйственная академия

СОДЕРЖАНИЕ ЛЕТУЧИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В МОЛОКЕ КОРОВ БОЛЬНЫХ МАСТИТОМ

В настоящее время мастит признан одной из распространенных акушерских патологий крупного рогатого скота [2, 3, 4, 5, 6].

Несмотря на большое количество научных исследований и создание широкого спектра антибактериальных препаратов, а также внедрение разных приемов профилактики заболевания, проблема маститов остается актуальной и требует дальнейших исследований [2, 4].

По мнению многих исследователей, основным этиологическим фактором возникновения мастита является микробное начало. Микрофлора молока и молочной железы при маститах отличаются большим разнообразием как отдельных видов (патогенных и условно-патогенных) микроорганизмов, так и высокой частотой и разнообразием их ассоциаций [6].

Цель нашего исследования заключалась в выяснении участия факультативных и облигатных микроорганизмов в воспалительном процессе.

Материалы и методы

Для бактериологического исследования от 50 коров больных маститом было взято 54 пробы молока. В качестве питательных сред использовали мясопептонный агар с добавлением 5% бараньей крови; солевой мясопептонный агар, содержа-